

University of Groningen

Altered lipid and bile acid metabolism in Glycogen Storage Disease type 1a: pathophysiological mechanisms and therapeutic opportunities

Hoogerland, Joanne

DOI:
[10.33612/diss.131695607](https://doi.org/10.33612/diss.131695607)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Hoogerland, J. (2020). *Altered lipid and bile acid metabolism in Glycogen Storage Disease type 1a: pathophysiological mechanisms and therapeutic opportunities*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.131695607>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER

7

English summary
Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
List of publications
Acknowledgements

Summary

Dysregulation of intrahepatic glucose signaling induces several serious metabolic responses that adversely affect health. The studies described in this thesis focus on the (patho)physiological consequences of constitutively activated hepatic glucose signaling as occurs in type 2 diabetes and Glycogen Storage Disease type 1a (GSD Ia). GSD Ia is an inherited disorder of carbohydrate metabolism caused by mutations in the catalytic subunit (G6PC) of the glucose-6-phosphatase (G6Pase) complex. G6PC is selectively expressed in liver, kidney and intestine and catalyzes the final step in gluconeogenesis and glycogenolysis by hydrolyzing glucose-6-phosphate (G6P) to glucose. G6PC is therefore critical for maintenance of systemic glucose homeostasis during fasting. GSD Ia patients clinically present with severe fasting intolerance and hepatomegaly, biochemically characterized by nonketotic hypoglycemia, hyperlactacidemia, hyperuricemia, hypercholesterolemia, hepatic steatosis, and hypertriglyceridemia. To prevent hypoglycemia, i.e. to maintain 'glycemic control', patients have to adhere to a strict dietary regime. This consists of frequent meals with restriction of simple sugars, regular intake of uncooked cornstarch, and/or continuous (nasogastric) drip feeding throughout the night. Dietary adherence generally markedly reduces hypoglycemic episodes and largely corrects secondary metabolic derangements. However, long-term complications of GSD Ia, like the development of liver adenomas in young adulthood, still frequently occur.

In clinical practice, triglyceride (TG) concentrations in GSD Ia patients are regarded as an important biomarker for glycemic control. Although hyperlipidemia in GSD Ia is related to glycemic control, the underlying mechanisms are poorly understood. In **chapter 2** we investigated the physiological mechanisms contributing to fatty liver disease and hypertriglyceridemia in GSD Ia. Whole-body TG metabolism was studied in normoglycemic and hypoglycemic hepatocyte-specific glucose-6-phosphatase deficient (*L-G6pc^{-/-}*) mice, a liver-specific mouse model for GSD Ia. Our studies revealed a marked difference in the origin of hepatic steatosis in normoglycemic *versus* hypoglycemic *L-G6pc^{-/-}* mice. Hepatic *de novo* fatty acid synthesis partly contributed to hepatic lipid accumulation in the normoglycemic state, while more severe liver steatosis in hypoglycemic *L-G6pc^{-/-}* mice resulted from enhanced adipose tissue lipolysis. Moreover, we observed an increase in hepatic very low-density lipoprotein (VLDL)-TG secretion and, specifically in the hypoglycemic state, a reduction in VLDL-TG catabolism. Overall, our findings indicate that impaired catabolism of TG-rich lipoproteins leads to hypertriglyceridemia in *L-G6pc^{-/-}* mice. Based on our results, we hypothesize that impaired TG catabolism is also most evident in GSD Ia patients with poor metabolic control.

In **chapter 3 and 4** we assessed the contribution of enhanced glycolysis and *de novo* lipogenesis to fatty liver disease in GSD Ia by targeting two different transcription

factors. Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) is a key regulator of glycolysis and lipogenesis, and its activity is increased in hepatic GSD Ia. We found that attenuation of hepatic ChREBP induction in L-G6pc^{-/-} mice aggravated hepatomegaly due to further accumulation of glycogen and lipids. These accumulations resulted from reduced glycolysis and suppressed VLDL-TG secretion. Importantly, we identified transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2), critical for VLDL formation, as a novel ChREBP target in mouse liver. In conclusion, we showed that hepatic ChREBP maintains TG balance by concomitantly regulating hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation and particularly VLDL-TG secretion. Enhanced ChREBP activity thus limits fatty liver development in GSD Ia by balancing hepatic TG production and –secretion.

Farnesoid X Receptor (FXR) is a key transcription factor controlling bile acid, lipid and glucose metabolism, and acts as a repressor of hepatic glycolysis and *de novo* lipogenesis. Pharmacological FXR agonists are currently in clinical evaluation for the treatment of fatty liver disease. In **chapter 4** we found that, upon treatment with the pharmacological FXR agonist PX20606, glycolytic pyruvate was directed towards G6P synthesis in the livers of L-G6pc^{-/-} mice. This resulted in a further accumulation of hepatic G6P while it diminished substrate availability for *de novo* lipogenesis. However, PX20606 treatment only partially reduced hepatic TG content in L-G6pc^{-/-} mice, which is in line with our finding in **chapter 2** that *de novo* lipogenesis only has a minor contribution to hepatic steatosis in GSD Ia. Overall, our study suggests a limited therapeutic effectiveness of PX20606, and therefore of FXR agonists in general, for the treatment of fatty liver in GSD Ia patients.

Bile acids facilitate absorption of dietary lipids and fat-soluble vitamins in the intestine but also act as signaling molecules that control glucose, lipid and energy metabolism. Bile acid metabolism, in turn, is controlled by several nutrient-sensitive transcription factors, and is perturbed in conditions of uncontrolled hyperglycemia and insulin resistance. In **chapter 5** we characterized the regulatory role of glucose, independent of insulin, in the control of hepatic bile acid synthesis. We showed that hepatic G6P regulates bile acid synthesis *via* ChREBP-dependent induction of CYP8B1 in mice. As a consequence, G6P-ChREBP signaling increased the relative abundance of cholic acid-derived bile acids and the bile acid composition shifted towards more hydrophobic bile. The G6P-ChREBP-dependent change in bile acid hydrophobicity in mice associated with reduced fecal neutral sterol loss and lower plasma campesterol/cholesterol ratios, compatible with enhanced intestinal cholesterol absorption. Additionally, we demonstrated in **chapter 5** that hepatic expression levels of CYP7A1, the rate-controlling enzyme in bile acid synthesis, correlated with circulating glucose levels in L-G6pc^{-/-} mice. Taken together, our findings thus indicate that blood glucose levels partly control hepatic CYP7A1

expression, while intrahepatic glucose (G6P) appears to be the major regulator of CYP8B1 expression. Moreover, we showed that hepatic ChREBP activity contributes to systemic cholesterol homeostasis in mice *via* a CYP8B1-dependent modulation of bile acid composition. The G6P-ChREBP-CYP8B1 signaling cascade that we have identified likely contributes to altered bile acid metabolism and its (patho)physiological consequences, such as altered cholesterol absorption, in conditions coinciding with excessive intrahepatic glucose signaling like GSD I. There are as yet no studies in GSD Ia patients focusing on disturbed bile acid metabolism and the consequences for intestinal cholesterol absorption. Future studies should focus on the contribution of intrahepatic G6P-CYP8B1 signaling and altered bile acid metabolism and cholesterol balance to hypercholesterolemia in GSD Ia.

In conclusion, the studies described in this thesis address the (patho)physiological consequences of disturbed intrahepatic glucose metabolism and signaling in a mouse model for hepatic GSD Ia. We showed that the glycemic state in GSD Ia affects VLDL-TG catabolism and fatty liver development, and we identified a novel link between hepatic glucose signaling and bile acid metabolism. The potential therapeutic effects of ChREBP inhibition and FXR activation were evaluated, showing that ChREBP maintained hepatic TG balance in GSD Ia and its increased activity limited fatty liver development. Importantly, our results indicated that *de novo* lipogenesis only marginally contributed to hepatic steatosis in GSD Ia, and that inhibition of this pathway *via* pharmacological FXR activation may not be sufficient to protect against fatty liver disease associated with this condition. Our work may provide a basis for the development of novel therapeutic strategies to reduce or prevent GSD Ia symptoms and complications. It furthermore contributes to a better understanding of the pathophysiology of other metabolic diseases in which intrahepatic glucose signaling is perturbed, such as type 2 diabetes.

Samenvatting

Verstoringen van de glucose signalering in levercellen veroorzaakt verschillende ernstige metabole reacties die de gezondheid nadelig kunnen beïnvloeden. De studies die beschreven zijn in dit proefschrift richten zich op de (patho)fysiologische gevolgen van continue geactiveerde hepatische glucose signalering, zoals die optreedt bij type 2 diabetes en in glycogenstapelingsziekte type 1a (GSD Ia). GSD Ia is een erfelijke aandoening van het koolhydraat metabolisme en wordt veroorzaakt door mutaties in de katalytische subeenheid (G6PC) van het glucose-6-fosfatase (G6Pase) complex. G6PC komt selectief tot expressie in de lever, nieren en darm en katalyseert de laatste stap in gluconeogenese en glycogenolyse middels de hydrolyse van glucose-6-fosfaat (G6P) tot glucose. G6PC is het belangrijkste enzym voor handhaving van de glucose homeostase tijdens vasten. GSD Ia patiënten vertonen ernstige vasten-intolerantie en hebben daarnaast een sterk vergrote lever (hepatomegalie). Op biochemisch niveau wordt GSD Ia gekenmerkt door niet-ketotische hypoglycemie, hyperlactacidemie, hyperurikemie, hypercholesterolemie, leversteatose en hypertriglyceridemie. Om hypoglycemieën te voorkomen en een goede 'glycemische controle' te bewerkstelligen, moeten patiënten zich houden aan een strikt dieet. Dit dieet bestaat uit frequente maaltijden met een beperkte hoeveelheid simpele koolhydraten, reguliere inname van complexe koolhydraten (ongekookt maiszetmeel; maizena) en/of continue sondevoeding gedurende de nacht. Het strikte dieet zorgt ervoor dat hypoglycemie minder vaak optreedt en dat secundaire biochemische symptomen grotendeels worden gecorrigeerd. Toch komen complicaties op lange termijn, zoals de ontwikkeling van leveradenomen op jong volwassen leeftijd, nog steeds voor.

In de kliniek worden triglyceride (TG) concentraties in het bloed van GSD Ia patiënten beschouwd als een belangrijke biomarker voor glycemische controle. Hoewel hyperlipidemie bij GSD Ia verband houdt met glycemische controle, zijn de onderliggende mechanismen van deze relatie grotendeels onbekend. In **hoofdstuk 2** hebben we de fysiologische mechanismen onderzocht die bijdragen aan leververvetting en hypertriglyceridemie in GSD Ia. Het TG metabolisme werd bestudeerd in normoglycemische en hypoglycemische hepatocyt-specifieke glucose-6-fosfatase deficiënte (*L-G6pc^{-/-}*) muizen, een lever-specifiek muismodel voor GSD Ia. Onze studies lieten een duidelijk verschil zien in de oorsprong van steatose in de lever van normoglycemische *versus* hypoglycemische *L-G6pc^{-/-}* muizen. Hepatische *de novo* vetzuur synthese droeg maar gedeeltelijk bij aan ophoping van vetten in de lever in de normoglycemische toestand, terwijl de veel ernstigere leversteatose bij hypoglycemische *L-G6pc^{-/-}* muizen het gevolg was van toevoer van vrije vetzuren door een verhoogde lipolyse in het vetweefsel. Bovendien hebben we bij *L-G6pc^{-/-}* muizen een verhoogde secretie van 'very low-density lipoprotein' (VLDL)-TG gemeten. Daarnaast vonden we in *L-G6pc^{-/-}* muizen in hypoglycemische toestand minder VLDL-TG katabolisme ten opzicht van de hypoglycemisch controle muizen.

Al met al geven onze bevindingen aan dat een verminderd katabolisme van TG-rijke lipoproteïnen leidt tot hypertriglyceridemie in hypoglycemische *L-G6pc^{-/-}* muizen. Op basis van onze resultaten veronderstellen we dat een verminderd TG katabolisme ook het meest uitgesproken is in GSD Ia-patiënten met een slechte glycemische controle.

In **hoofdstuk 3 en 4** hebben we de bijdrage van verhoogde glycolyse en *de novo* lipogenese aan leververvetting in GSD Ia muizen geëvalueerd door ons te richten op twee verschillende transcriptiefactoren. Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) is een belangrijke regulator van glycolyse en lipogenese, en ChREBP activiteit is verhoogd in de GSD Ia lever. We vonden dat remming van hepatische ChREBP activiteit in *L-G6pc^{-/-}* muizen de hepatomegalie verergerde als gevolg van verdere ophoping van glycogeen en lipiden. Deze ophopingen waren het gevolg van verminderde glycolyse en verlaagde VLDL-TG-secretie. Een belangrijke nieuwe bevinding is dat transmembraan 6 superfamilielid 2 (TM6SF2), cruciaal voor VLDL-vorming, een ChREBP target gen is in de lever van muizen. We toonden dus aan dat ChREBP het TG evenwicht in de lever bewaakt door gelijktijdig de lipogenese, de vetzuur oxidatie en met name de VLDL-TG secretie te reguleren. Verhoogde ChREBP activiteit in GSD Ia beperkt de ontwikkeling van vette lever door de hepatische TG productie en –secretie op elkaar af te stemmen.

Farnesoid X Receptor (FXR) is een belangrijke transcriptiefactor die het galzout-, lipide- en glucose metabolisme reguleert, en fungeert als een negatieve regulator van hepatische glycolyse en *de novo* lipogenese. Farmacologische FXR agonisten worden momenteel klinisch getest voor de behandeling van leververvetting. In **hoofdstuk 4** vonden we dat behandeling van *L-G6pc^{-/-}* muizen met de farmacologische FXR agonist PX20606, leidde tot een verhoogde omzetting van glycolytisch pyruvaat in G6P in de lever. Daardoor werd de ophoping van G6P in de lever verder bevorderd terwijl de substraat beschikbaarheid voor *de novo* lipogenese werd verminderd. Behandeling met PX20606 resulteerde echter slechts tot een gedeeltelijke verlaging van de hoeveelheid TG in de lever van *L-G6pc^{-/-}* muizen. Deze bevinding is in overeenstemming met onze resultaten in **hoofdstuk 2**, namelijk dat *de novo* lipogenese slechts in geringe mate bijdraagt aan leververvetting in GSD Ia. Al met al suggereert onze studie dat PX20606, en gebruik van een FXR agonist in het algemeen, slechts een beperkte therapeutisch effect zal hebben in de behandeling van leververvetting bij GSD Ia patiënten.

Galzouten zorgen voor de opname van vetten en van vet- oplosbare vitamines uit het voedsel vanuit de darm, maar werken ook als signaalmoleculen die het metabolisme van glucose, lipiden en energie regelen. Het galzout metabolisme wordt op zijn beurt gereguleerd door verschillende transcriptiefactoren die gevoelig

zijn voor voedingsstoffen. Deze regulatie wordt verstoord door ongecontroleerde hyperglycemieën en insuline resistentie. In **hoofdstuk 5** hebben we de regulerende rol van glucose, onafhankelijk van insuline, op de galzout synthese in de lever gekarakteriseerd. We toonden aan dat G6P in de lever de galzout synthese reguleert in muizen *via* een ChREBP-afhankelijke inductie van CYP8B1. Als gevolg daarvan resulteerde G6P-ChREBP signalering in een relatieve verhoging van cholaat afgeleide galzouten waardoor de galzout samenstelling hydrofober werd. De G6P-ChREBP afhankelijke verandering in galzout hydrofobiciteit bij muizen was geassocieerd met een verlaging van de fecale neutrale sterolen uitscheiding en lagere plasma campesterol/cholesterol ratio's. Deze veranderingen duiden op een verhoogde cholesterol absorptie door de darm. Daarnaast hebben we in **hoofdstuk 5** aangetoond dat het hepatische expressie niveau van CYP7A1, het enzym dat de snelheid van galzout synthese reguleert, gecorreleerd is aan de bloedsuikerspiegel in *L-G6pc^{-/-}* muizen. Samengevat geven onze bevindingen dus aan dat de bloedsuikerspiegel gedeeltelijk de expressie van CYP7A1 in de lever reguleert, terwijl intrahepatisch glucose (G6P) een belangrijke regulator van de CYP8B1 expressie lijkt te zijn. Daarnaast blijkt uit ons onderzoek dat ChREBP activiteit in de lever bijdraagt aan systemische cholesterol homeostase in muizen *via* een CYP8B1 afhankelijke regulatie van de galzout samenstelling. In metabole aandoeningen met overmatige intrahepatische glucose signalering, zoals GSD Ia, draagt de G6P-ChREBP-CYP8B1 signaleringcascade waarschijnlijk bij aan het veranderde galzout metabolisme en de (patho)fysiologische gevolgen hiervan, zoals veranderde cholesterol absorptie. Er zijn momenteel geen studies bekend waarin het galzout metabolisme en de cholesterol opname in GSD Ia-patiënten onderzocht is. Het zou derhalve interessant zijn om in de toekomst onderzoek te doen naar de bijdrage van intrahepatische G6P-CYP8B1 signalering aan hypercholesterolemie in GSD Ia.

De studies beschreven in dit proefschrift behandelen de (patho)fysiologische gevolgen van een verstoord intrahepatisch glucose metabolisme en -signalering in een lever-specifiek muismodel voor GSD Ia. We toonden aan dat de glycemische toestand in GSD Ia het VLDL-TG katabolisme en de ontwikkeling van leververvetting beïnvloedt, en we ontdekten een nieuw verband tussen hepatische glucose signalering en het galzout metabolisme. De potentiële therapeutische effecten van ChREBP remming en FXR activatie werden geëvalueerd. Deze studies toonden aan dat ChREBP de TG balans in de lever van GSD Ia handhaaft, en dat een verhoogde ChREBP activiteit derhalve juist de ontwikkeling van leververvetting in GSD Ia muizen beperkt. Onze resultaten lieten tevens zien dat *de novo* lipogenese slechts in beperkte mate bijdraagt aan leververvetting in GSD Ia, en dat remming van deze route *via* farmacologische FXR activatie waarschijnlijk niet voldoende effectief is om leververvetting te voorkomen. Deze inzichten kunnen een basis vormen voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën om de symptomen en complicaties van GSD Ia

te behandelen of te voorkomen. Daast dragen zij bij aan een beter begrip van de pathofysiologie van veel voorkomende metabole ziekten waarbij de intrahepatische glucose signalering verstoord is, zoals type 2 diabetes.

Curriculum Vitae

Johanna Anne (Joanne) Hoogerland was born on March 26th 1991 in Goes, The Netherlands. She finished her pre-university education (VWO) at the Calvin College in 2009, and started studying Nutrition and Health at the Wageningen University. She obtained her Bachelor in 2012 and continued with the Master Nutrition and Health, specialization Molecular Nutrition and Toxicology. During her master she wrote her thesis about the cross-talk between basophils and dendritic cells upon probiotic stimulation, under supervision of prof. dr. H.F.J. Savelkoul at the department of Cell Biology and Immunology. Her Master was successfully completed by a research internship at the Erasmus MC, Rotterdam, where she studied the effect of aging and whole life probiotic intervention on the immune system in mice, supervised by dr. P.J.M. Leenen.

In 2015 she started her PhD at the department of Pediatrics, Center for Liver, Digestive, and Metabolic Diseases, at the University Medical Center Groningen, under supervision of dr. M.H. Oosterveer and prof. dr. F. Kuipers. The results of her PhD project entitled 'Altered lipid and bile acid metabolism in Glycogen Storage Disease type Ia: pathophysiological mechanisms and therapeutic opportunities' are summarized in this dissertation.

In September 2019 she joined the research group of prof. dr. B. Staels and dr. D. Dombrowicz at the Institut Pasteur de Lille, France, where she is working as a post-doctoral researcher.

List of publications

- Lei Y, **Hoogerland JA**, Bloks VW, Bos T, Bleeker A, Wolters H, Wolters JC, Hijmans BS, van Dijk TH, Thomas R, van Weeghel M, Mithieux G, Houtkooper RH, de Bruin A, Rajas F, Kuipers F, Oosterveer MH. Hepatic ChREBP activation limits NAFLD development in a mouse model for Glycogen Storage Disease type Ia. *Hepatology*. 2020 Feb; doi: 10.1002/hep.31198. [Epub ahead of print]
- Saeed A, **Hoogerland JA**, Wessel H, Heegsma J, Derks TGJ, van der Veer E, Mithieux G, Rajas F, Oosterveer MH, Faber KN. Glycogen storage disease type Ia is associated with disturbed vitamin A metabolism and elevated serum retinol levels. *Hum Mol Genet*. 2020;29(2):264-273.
- **Hoogerland JA**, Lei Y, Wolters JC, de Boer JF, Bos T, Bleeker A, Mulder NL, van Dijk TH, Kuivenhoven JA, Rajas F, Mithieux G, Haeusler RA, Verkade HJ, Bloks VW, Kuipers F, Oosterveer MH. Glucose-6-phosphate regulates hepatic bile acid synthesis in mice. *Hepatology*. 2019 Dec;70(6):2171-2184.
- Van Beek AA, Sovran B, Hugenholtz F, Meijer B, **Hoogerland JA**, Mihailova V, van der Ploeg C, Belzer C, Boekschoten MV, Hoeijmakers JH, Vermeij WP, de Vos P, Wells JM, Leenen PJ, Nicoletti C, Hendriks RW, Savelkoul HF. Supplementation with *Lactobacillus plantarum* WCFS1 prevents decline of mucus barrier in colon of accelerated aging *Ercc1-Δ7* mice. *Front Immunol*. 2016 Oct;7:408. eCollection 2016.
- Van Beek AA, **Hoogerland JA**, Belzer C, De Vos P, De Vos WM, Savelkoul HF, Leenen PJ. Interaction of mouse splenocytes and macrophages with bacterial strains *in vitro*: the effect of age in the immune response. *Benef Microbes*. 2016;7(2):275-87.
- **Hoogerland JA**, Peeks F, Hijmans BS, Wolters JC, Kooijman S, Bos T, Bleeker A, van Dijk TH, Wolters H, Gerding A, Havinga R, Pronk ACM, Rensen PCN, Mithieux G, Rajas F, Kuipers F, Reijngoud DJ, Derks TGJ and Oosterveer MH. Hypoglycemia aggravates dyslipidemia in GSD Ia *via* enhanced adipocyte lipolysis and impaired VLDL catabolism Link between hypoglycemia and dyslipidemia in GSD Ia. *Submitted*.
- **Hoogerland JA**, Bloks VW, Bos T, van Dijk TH, Wolters JC, de Boer JF, Rajas F, Mithieux G, van Weeghel M, Houtkooper RH, Kuipers F and Oosterveer MH. Pharmacological FXR activation redirects pyruvate towards glucose-6-phosphate and only slightly reduces hepatic steatosis in a mouse model for Glycogen Storage Disease type Ia. *In preparation*.

Acknowledgements

Het past me om als eerste God dank te zeggen voor alles wat nodig was om het werk te doen en dit proefschrift te schrijven. “*Looft den HEERE, want Hij is goed, want Zijn goedertierenheid is tot in eeuwigheid*” (Psalm 136:1).

Graag wil ik mijn promotor **prof. dr. F. Kuipers** en copromotor **dr. M.H. Oosterveer** bedanken. Beste **Folkert**, dankjewel voor het delen van je kennis over het galzout-, glucose- en lipide metabolisme, wat essentieel was voor het tot stand komen van mijn proefschrift. Ik heb veel geleerd van onze discussies over de resultaten, van je input op de manuscripten, maar ook van je nuchtere kijk op alle bijkomende zaken. Beste **Maike**, ook al verschillen onze karakters als dag en nacht van elkaar, ik ben erg blij dat je mijn supervisor was. Je was altijd beschikbaar voor vragen en discussies, die meestal resulteerden in het bedenken van nieuwe experimenten. Ik heb ontzettend veel geleerd van je (snelle!) manier van denken en verbanden leggen, en van de wijze waarop je onderzoek en resultaten uitlegt en presenteert. Je enthousiasme is bewonderenswaardig. Ik heb genoten van elk experiment dat ik ‘even’ moest doen en van alles dat nog ‘even’ gemeten moest worden, al verschillen we wel van mening over de tijdsduur van het begrip ‘even’. Uiteindelijk resulteerde het in mooie artikelen waar we trots op mogen zijn. Dankjewel voor je begeleiding en het stimuleren van mijn (wetenschappelijke) ontwikkeling!

De leden van de leescommissie, **prof. dr. M. Brouwers**, **prof. dr. K. Schoonjans** en **prof. dr. J.A. Kuivenhoven**, wil ik graag bedanken voor de tijd die zij hebben genomen om mijn proefschrift te lezen en te beoordelen. Leden van mijn PhD commissie, **prof. dr. A.J.A. van de Sluis**, **prof. dr. T. Plösch** en **prof. dr. H.J. Verkade**, bedankt voor jullie waardevolle input tijdens onze meetings. I would also like to thank **dr. M.L. Eggersdorfer** for your support and discussions during our meetings.

Graag wil ik ook alle PI's van de afdeling bedanken: **Karin, Marit, Barbara, Dirkjan, Hans, Janine, Henkjan, Kuif, Bart, Eline, Uwe, Alain, Debby, Kathrin, Klaas-Nico** (MDL), **Han** (MDL). Bedankt voor jullie hulp, suggesties, discussies, feedback en vragen tijdens meetings. Speciale dank aan **Bert** voor de uitnodiging voor een sollicitatiegesprek in Groningen, nadat we elkaar hadden ontmoet bij Nutricia.

Zonder analisten geen PhD thesis. **Trijnie**, je hebt ontelbaar veel levers gecrusht, B&D's gedaan, RNA (en DNA!) samples geïsoleerd en qPCRs gepipetteerd. Zonder jouw werk was ik waarschijnlijk nog lang niet aan schrijven toegekomen. Dankjewel voor al je hulp, je rust (hoeveel samples het ook waren) en het houden van overzicht (jouw labjournaal en -80 lijst zijn eigenlijk de belangrijkste ‘referenties’ van dit proefschrift). **Aycha**, wat er ook gebeurt, jij blijft altijd vrolijk en behulpzaam voor iedereen. Je bent altijd in voor een grapje of een toepasselijke opmerking. Dankjewel voor je hulp in het lab en alle gezelligheid! **Niels**, jij weet altijd alles. Daarom kwam

ik ook graag even bij je langs met een vraag, of gewoon om de laatste (lab)nieuwtjes te horen. Naast al je hulp in het lab ook bedankt voor de gezelligheid daarbuiten. Ik hoop dat we in de toekomst onze bier- (en bij mooi weer BBQ-) avondjes met nacho's (natuurlijk uit de oven, hoe anders?!) gewoon doorzetten! **Henk**, zoals je zelf eens zei, zijn wij eigenlijk tweeling met een paar jaar ertussen. Je hebt een geweldig gevoel voor humor en je zorgde er vaak voor dat ik met een glimlach door het lab liep. Dankjewel voor je hulp, met name voor het doen van de luciferase assays toen ik al in Lille zat. **Renze, Angelika, Martijn K, Theo B, Ingrid, Roos, Milaine, Niels K, Mirjam, Albert, Eline, Ydwine, Nicolette, Marieke, Tjasso, Jeanette, Manon en Dianne**, dankjewel voor al jullie hulp en de gezelligheid op het lab.

Vincent en Theo, 'buurmannen', een speciaal dankwoord voor jullie. Of dit op eigen verzoek is, laten we maar even in het midden. **Vincent**, zoals voor de meeste PhD studenten, was statistiek ook voor mij een uitdaging en klopte ik dus regelmatig bij je aan voor uitleg. Daarnaast was het fijn dat je mee dacht met het onderzoek, wat meestal begon met een recente paper in de mailbox, en resulteerde in veel mailtjes over en weer, hypotheses, en nog meer papers. Dankjewel ook dat je me introduceerde in de wereld van MathInspector en ChIP-seq databases! **Theo**, natuurlijk heb je veel voor me gerekend aan de lipogenese en cholesterol data, dankjewel daarvoor. Maar wat ik eigenlijk nog meer waardeerde, waren de (voor mij vroege) ochtenden op het CDP voor de S4048 proeven. Lijnen vullen, pompen op druk brengen, muizen aansluiten, glucoses meten, en ondertussen een beetje kletsen. Zo samen de proef opstarten beviel me prima! Vincent en Theo, dank jullie wel voor jullie hulp, voor het lezen en corrigeren van de manuscripten en voor de discussies en (soms kritische) vragen. Vooral ook dank voor de gesprekjes over allerlei zaken die niet direct met het onderzoek te maken hadden. Ik vond het altijd gezellig om nog even te blijven hangen voor een praatje. Zoals het spreekwoord luidt: 'Een goede buur is beter dan een verre vriend'.

Hilde, Paula, Evelien en Gea, bedankt voor jullie hulp bij alles wat geregeld moest worden en voor de gezelligheid tussen de regel-dingen door.

Ook wil ik graag alle **medewerkers van het CDP** bedanken voor jullie hulp en het verzorgen van de dieren. **Ar, Gerward en Achmed Youfi** (hey, hoe ist?!), dank jullie wel dat jullie vaak de tijd namen om even een praatje te maken!

A major thanks to the Oosterveer group and all other colleagues. **Martijn**, ik weet zeker dat zowel jij als ik het opofferen van de muizen van jouw eerste dierproef niet snel zullen vergeten! **Angela**, ik heb respect voor jouw doorzettingsvermogen bij al die lange programming proeven. Ik hoop dat het uiteindelijk mooie resultaten oplevert! **Kishore**, you are an enthusiastic and (seemingly) always happy researcher. **Yu**, thanks for your help and good luck with your new job! **Fabian**, jij doet veel

tegelijk, maar hebt ook altijd tijd voor een gezellig praatje. Succes met het afronden van jouw thesis. Office mates **Rumei, Jing, Mengfan, Josie, Sandra, Archie, Antonio, Marcella, Marleen S**, thank you for sharing the office and cookies, cakes, talks, laughter, complaints and stories. **Archie**, I liked making jokes with you, and I especially remember our 'candlelight dinner' and your facial expression when you discovered Ctrl+Shift+T. Good luck with finishing your thesis! **Onne** (wie had gedacht dat we op dezelfde dag zouden promoveren? Succes!), **Mirjam, Rima, Congzhuo, Raphael, Dorieke, Hilde, Lori, Maaïke B** (sommige woorden hoorde ik voor het eerst, toen je mij een middagje hielp op het CDP...), **Andrea** (op naar nog veel domibo's en biertochten!), **Anna B, Anna P, Karen** (jij was altijd in voor een vrijmibo), **Danial** (thanks for all the conversations in the lab, while I was pipetting 348-wells plates), **Juifang** (you were so brave to try foie gras... let's have dinner together again, when you visit Lille!), **Ivo, Ana** (I always think of unicorns when I see you), **Esther, Ali, Fabio** (our office was almost your 'second home'), **Turu, Fan, Dicky, Tim, Alfredo, Sara, Agnieska, Anne-Claire, Stijn, Venetia, Anouk, Melinde, Andries, Christy, Chris, Frederico, Natalia, Willemien, Dyonne, Lars, Ulrike, Alex, Marti, Marcel, Mathilda** en, niet te vergeten, **Otto** (altijd even de deur open houden), thank you all for the good times that we shared.

Beste paranimfen, beste **Marleen** en **Rick**. **Marleen**, onze PhD's liepen ongeveer gelijk op, en naast elkaar helpen in het lab en op het CDP, konden we ook altijd onze ervaringen en frustraties bij elkaar kwijt. Het samen eten, sporten en 'sporten', en de vrijmibo waren een belangrijk onderdeel van mijn tijd in Groningen, en ik mis het nu ik in Lille zit (leuk dat je er een weekendje was)! Ik denk met veel plezier terug aan onze vakanties (al is vakantie voorafgaand aan een congres niet perse aan te raden). Foto's maken is niet aan mij besteed, maar jij hebt dit ruimschoots gecompenseerd. Dankjewel voor de vriendschap, voor de gezelligheid en dankjewel dat je mijn paranimf wilt zijn. Succes met het afronden van jouw thesis, dat gaat je vast en zeker lukken! **Rick**, de planning van mijn eerste galcanulatie staat me nog vers in het geheugen (HALLO), en het was het begin van 4 jaar gezelligheid, mooie gesprekken, leerzame momenten en vele uren CDP. Ik heb genoten van alle experimenten die we samen deden, voorafgegaan door koffie, afgesloten met koffie en koekjes (vooral de koekjes zijn belangrijk), en daar tussenin veel lachen en praten en, oh ja, ook nog doorwerken. Je hebt mijn muzikale en literaire kennis wat bijgeschaafd en aangevuld met jouw favorieten, en gelukkig ben je daar niet mee gestopt nu ik in Lille zit. Dankjewel voor onze gesprekken en 'evalutaties' (al dan niet onder het genot van een speciaal biertje) en voor onze vriendschap. Ik weet dat ik je ermee verraste, maar ik ben blij dat je mijn paranimf wilt zijn!

Ik wil ook graag mijn vrienden en familie bedanken. **Kiki**, wat fijn dat we onze etentjes (en de koek en kaassoep wil ik hier ook graag even noemen) gewoon door

konden zetten in Groningen omdat jij hier ook je PhD ging doen! Jouw traject had op allerlei vlak wat meer hobbels dan het mijne, en ik ben dan ook ontzettend trots op je dat je alles goed afgerond hebt. **Nick**, wij zijn vooral heel goed in Carcassonne spelen en dan (bijna) vergeten dat er ook andere mensen mee doen. En ik denk altijd nog lachend terug aan onze fitness sessies in Wageningen. **Nick & Kiki** en **Lena** (en Muts en Muppet), bedankt voor jullie vriendschap en nodige momenten van ontspanning tijdens mijn PhD! **Astrid**, jij bent altijd in voor een dagje shoppen, een etentje of uitje. Dankjewel voor je positiviteit en gezelligheid, en jij bent de volgende die promoveert! **Berdien & Jakob**, al we zien elkaar wat minder vaak, het is altijd gezellig!

Eline, Jozanneke, Adriaan, Emmelie, Amanda, bedankt voor jullie interesse in mijn onderzoek en de weekendjes Groningen (of Rotterdam). Iets plannen is soms ingewikkeld omdat we verspreid over Nederland wonen, maar het is altijd fijn om elkaar weer te zien!

Rick & Janke, dank jullie wel voor alle gezelligheid en mooie gesprekken tijdens de ‘domibo’s’ en HAVING A parties. Hopelijk volgen er nog veel meer!

‘**Schone familie**’, dank jullie wel voor het warme welkom, de ‘sappies’ en de gezelligheid. Ik hoop dat ik nog eens (West-)Fries leer praten (en verstaan)!

Lieve **papa** en **mama**, dankjewel voor alles wat jullie voor mij hebben gedaan, en nog steeds doen. Dankjewel voor jullie steun en de interesse in het hele promotietraject, jullie hebben me altijd het vertrouwen gegeven ‘dat het vast wel zou lukken’. Qua afstand kon ik niet verder van Zeeland vandaan zijn en de ritjes Groningen-Zeeland werden wat spaarzamer naarmate mijn PhD vorderde, maar ook in Groningen blijf ik toch ‘een trotse Zeeuwse’. **Rinus & Anique** (het is heerlijk om altijd alles met je te kunnen delen en dan jouw nuchtere antwoorden te horen), **Gerard** (met jou kan ik altijd lachen en een beetje ‘klieren’) & **Carly, Arinda** (mijn jongste zusje; ik ben ontzettend trots op jou!), **Henk** (na jouw geboorte kwam ik er al vrij snel achter dat er werkende flitspalen op de ring van Groningen staan), **Leen, Cora** en **Marthe**, dank jullie wel voor alle fijne momenten samen, in Zeeland of in Groningen.

Tot slot wil ik graag **Jan Freark** bedanken. Lieve JF, onze eerste ‘kennismaking’ was via jouw promotiefilmpje. Men zegt dat de eerste indruk bepalend is, en misschien is dat ook wel zo. Ik kon altijd bij je terecht voor lab-gerelateerde vragen, maar liever nog voor lab-ongerelateerde dingen als (steeds langere) koffiepauzes, een biertje, pizza (wanneer ik wat langer door werkte, kostte het je weinig moeite om mij over te halen) en BBQ. Je gevoel voor humor, je relativiseringsvermogen en nuchtere kijk op alles was (en is) belangrijk voor me. Dat we nu alweer een tijdje samen zijn verraste nagenoeg niemand. Dankjewel voor de steun die je me gaf tijdens mijn PhD en in

de afrondende fase daarvan. Ook voor het voorzichtig afdwingen van onze vakantie; de Trolltunga beklimmen doen we zeker nog eens (zonder garantie, maar misschien starten we dan nog iets vroeger)! Dankjewel voor je support bij het nadenken over, en het doen van een postdoc. Deze tijd van 'weekendjes' komen we wel door. Ik kijk er naar uit om straks 'echt' samen te zijn!